

CENTRO PROVINCIAL DE HIGIENE EPIDEMIOLOGÍA Y MICROBIOLOGÍA GUANTÁNAMO

EVALUACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MOTILIDAD – INDOL MODIFICADO EN CPHEM DE GUANTÁNAMO

Lic. Lourdes M. Expósito Boué¹, Tec. Ana Belkis Bott Croublet², Dra. Iliana de la Torre Rosés³, Lic. Yamilé Betancourt Arguello¹, Dra. Marina Sánchez Romero.⁴

1 Máster en Enfermedades Infecciosas. Licenciada en Microbiología. Asistente.

2 Técnico en Microbiología.

3 Máster en Enfermedades Infecciosas. Especialista de II Grado en Microbiología. Profesor Auxiliar.

4 Máster en Enfermedades Infecciosas. Especialista de I Grado en Microbiología.

RESUMEN

La investigación se realiza en el Laboratorio de Microbiología del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM) de Guantánamo, en el año 1991, por el insuficiente suministro de bases nutritivas presentes en los medios de cultivo Agua de Triptona y Motilidad, con el objetivo de diseñar un nuevo medio capaz de brindar ambas informaciones. Se realiza control de calidad y siembra concurrente de 200 cepas de Enterobacterias previamente identificadas, en los medios de referencia Motilidad y Agua de Triptona y el nuevo medio Motilidad-Indol. Se realiza su evaluación con la aplicación de las fórmulas correspondientes y se obtienen valores de 100 % de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo, que informan la correspondencia de los resultados con la utilización de los medios de cultivo de referencia y el nuevo medio. Se concluye que la nueva fórmula mantiene la calidad de diagnóstico de Enterobacterias y contribuye al ahorro de recursos materiales.

Palabras clave: medio de cultivo, sensibilidad, especificidad, valor predictivo positivo y negativo.

INTRODUCCIÓN

El reordenamiento de la economía nacional y la crisis económica mundial impone la necesidad de ser cada vez más racionales con los recursos que se disponen, por lo que se realizó una revisión de los medios diagnósticos utilizados en microbiología para tomar medidas encaminadas al ahorro de reactivos químicos, cristalería y bases nutritivas.

Dentro de las bases nutritivas encontramos diferentes peptonas, presentes en numerosos medios de cultivo destinados para el crecimiento de microorganismos que requieren de compuestos nitrogenados de naturaleza proteica, tales como: péptidos, polipéptidos, aminoácidos, también aportan vitaminas, carbohidratos y otros elementos nutritivos.

La peptona bacteriológica es un componente del medio Motilidad, utilizado para mostrar la capacidad de movimiento de las bacterias. La triptona es la peptona presente en Agua de Triptona, utilizado en la detección de indol. Ambos medios de cultivo son utilizados en la identificación bioquímica de enterobacterias.¹⁻³

El insuficiente abastecimiento de peptona afecta el diagnóstico microbiológico de enterobacterias, bacterias que con mucha frecuencia se aíslan en la práctica microbiológica.

MÉTODO

La investigación se realiza en el Laboratorio de Microbiología del Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología de Guantánamo, en el año 1991, con el objetivo de fusionar los medios de Motilidad y Agua de Triptona en una sola formulación, capaz de dar información sobre la movilidad y producción de indol, con igual calidad que los medios de referencia.

El universo de estudio está conformado por 200 cepas de enterobacterias aisladas de diferentes muestras clínicas y perfectamente identificadas, las cuales se inoculan de forma paralela en los medios de referencia (Motilidad y Agua de Triptona) y el nuevo medio Motilidad-Indol.

Técnicas y procedimientos de laboratorio para la obtención del dato primario.

1. Análisis de la formulación de los medios de cultivo a fusionar.

A continuación se exponen la composición de los medios de cultivo de referencia y el análisis realizado para fusionarlos:

MEDIO DE CULTIVO DE MOTILIDAD		MEDIO DE CULTIVO AGUA DE TRIPTONA	
COMPOSICIÓN	g/L	COMPOSICIÓN	g/L
Peptona bacteriológ.	10.0	Triptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0	Cloruro de sodio	5.0
Extracto de carne	3.0	-	-
Agar	4.0	-	-
pH	7.3	pH	7.5 ± 0.2

Se realiza el análisis de aporte de cada compuesto dentro del medio de cultivo, donde las bases nutritivas (peptona y triptona) aportan el nitrógeno para la síntesis de las proteínas; el cloruro de sodio proporciona el medio isotónico para el crecimiento de los microorganismos; el extracto de carne aporta compuestos nitrogenados, vitaminas y minerales; y el agar proporciona un medio semisólido que permite evidenciar el movimiento de la bacteria.

Al comparar el contenido de sales minerales y aminoácidos de ambas peptonas se encuentra que la triptona presenta mayor concentración de algunos aminoácidos, fundamentalmente el triptófano, sustrato indispensable para la detección de indol, por lo que se propone sustituir la peptona bacteriológica del medio Motilidad por triptona del Agua de Triptona, prescindiendo de cloruro de sodio ya que la fórmula de la Motilidad incluye este reactivo en igual cantidad.^{1,2}

El nuevo medio de cultivo quedó diseñado como se muestra:

Medio de Motilidad – Indol (modificado)

Composición	g / l
Triptona	10.0
Cloruro de sodio	5.0
Extracto de carne	3.0
Agar	4.0
pH	7.5 ± 0.2

Inoculación, lectura e interpretación de los resultados: El medio se inocula por punción, se incuba durante 18 a 24 horas a 37 °C. La lectura de motilidad se realiza por la turbidez del medio a ambos lados de la línea de inoculación del microorganismo en estudio. Luego, se añade unas gotas de reactivo de Kovac para determinar presencia de indol. El cambio de color se observa en la superficie del medio.

2. Control de calidad⁴⁻⁶

Una vez diseñado el nuevo medio, cada lote se somete a ensayo para asegurar su aceptación y demostrar su actividad bacteriana; se comprueba: valor de pH, esterilidad, capacidad de crecimiento con las cepas normadas para el control biológico (*Escherichia coli* / *Klebsiella pneumoniae*) y estabilidad.

3. Técnicas de análisis estadístico^{7,8}

Se aíslan en el laboratorio 200 cepas de Enterobacterias, las cuales son identificadas previamente e inoculadas de forma concurrente en los medios de referencia Motilidad y Agua de Triptona y el nuevo medio diseñado Motilidad-Indol, para comparar resultados y determinar:

1. Confiabilidad o reproducibilidad: Mide nivel de concordancia entre pruebas repetidas.
2. Validez (sensibilidad y especificidad) y rendimiento (valor predictivo positivo y negativo): Se utilizan las fórmulas correspondientes para este fin y se confecciona hoja de cálculo, donde se introducen los valores de las categorías siguientes:
 - a) Verdaderos positivos: La prueba en los medios de referencia y en el propuesto es positiva.
 - b) Verdaderos negativos: La prueba en los medios de referencia y en el propuesto es negativa.
 - c) Falsos positivos: La prueba en los medios de referencia es negativa y en el propuesto es positiva.
 - d) Falsos negativos: La prueba en los medios de referencia es positiva y en el propuesto es negativa.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A lo largo de la historia de la Microbiología, son los propios microbiólogos los que han ido diseñando los medios de cultivo de acuerdo a las bacterias que desean cultivar, y su desarrollo va dirigido a la fabricación de un producto estable y reproducible.²

Al fusionar el medio de cultivo Agua de Triptona y Motilidad, a partir de los razonamientos teóricos descritos anteriormente, se diseñó el nuevo medio de cultivo llamado Motilidad-Indol, semisólido y con la transparencia adecuada para visualizar la movilidad o inmovilidad de los microorganismos. Además, la triptona satisface los requerimientos nutricionales de las bacterias y proporciona el aminoácido triptófano, sustrato sobre el que actúa la enzima triptofanasa presente en algunas especies de microorganismos, capaz de hidrolizar y desaminar el triptófano, produciendo indol, ácido pirúvico y amoníaco. El indol, al ponerse en contacto con el grupo aldehído del p-dimetilaminobenzaldehído contenido en el reactivo de Kovac o Ehrlich, forma un complejo rojo en la superficie del medio. Si el microorganismo no posee la enzima triptofanasa no hay formación de anillo rojo después de la adición del reactivo de Kovac.⁹

Al realizar el control de calidad a los diferentes lotes del medio Motilidad-Indol confeccionados, se obtuvo:

1. El pH osciló entre 7.3 y 7.6, valores que se encuentran dentro del rango adecuado de variabilidad, que es de 7.3 a 7.7.
2. En el control de esterilidad al incubar el 5 % de los tubos, no se obtuvo crecimiento bacteriano, lo que informa que el proceso de esterilización fue correcto.
3. La capacidad de crecimiento de las cepas control coincidieron con los obtenidos en los medios de referencia y se obtuvieron los resultados esperados con las diferentes cepas: *Escherichia coli*, Motilidad e indol positivos y *Klebsiella pneumoniae*, Motilidad e indol negativos.
4. El medio es estable, ya que durante su conservación en refrigeración, con periodicidad semanal, se repitieron las pruebas anteriores, las que en todo momento tuvieron resultados satisfactorios.

Los resultados del control de calidad expresan que el medio pasó la prueba satisfactoriamente.

Evaluación del medio Motilidad-Indol

1. *Confiabilidad o reproducibilidad*: La formulación modificada resultó reproducible, existiendo concordancia de los resultados obtenidos con los diferentes lotes confeccionados, lo que indica la estabilidad y reproducibilidad del nuevo medio diagnóstico.
2. *Validez y rendimiento*: Al determinar los verdaderos positivos y negativos producto de la siembra concurrente de las 200 cepas de Enterobacterias, se encontró que existió correspondencia total de

los resultados con utilización de los medios de referencia (Motilidad y Agua de Triptona) y el nuevo medio Motilidad-Indol, no se determinaron falsos positivos y negativos, es decir, todos los lotes mostraron con una misma cepa la misma reacción. Se obtuvieron 145 cepas Motilidad positiva y 96 Indol positiva (verdaderos positivos) y 55 Motilidad negativa y 104 Indol negativa (verdaderos negativos). La sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo del nuevo medio con relación a los de referencia fue del 100 %.

En la literatura revisada se registran otros medios de cultivo, tales como: Motilidad Indol Ornitina, Sulfato Indol Motilidad, Cistina Triptica Agar, Motilidad Indol Lisina, Manitol Movilidad. Como su nombre indica, con ellos se puede determinar la movilidad y otras características bioquímicas de las bacterias. Son más complejos en su formulación, por lo tanto, su precio es mayor. Son utilizados en algunas investigaciones.¹⁰⁻¹²

El medio Motilidad-Indol descrito en esta investigación es más sencillo y económico. Cumple con los requisitos que se aspira en todo medio de cultivo: Ser estable y reproducible. No se informa en la literatura revisada un medio similar y es útil en el diagnóstico microbiológico de un Laboratorio Básico de Microbiología.

Es un medio más económico que los medios de referencia, ya que por cada litro de medio confeccionado se ahorran 10 y 5 gramos de peptona y cloruro de sodio, respectivamente. Además, se ahorra cristalería, tiempo de trabajo y energía. Ha sido utilizado de forma ininterrumpida a partir del año 1991 en el Laboratorio de Microbiología del CPHEM.

CONCLUSIONES

Se logró diseñar, implementar y evaluar el nuevo medio Motilidad-Indol, obteniéndose valores de sensibilidad, especificidad y valor predictivo positivo y negativo que garantizan la calidad de los resultados en la identificación de Enterobacterias.

El control de calidad y la siembra concurrente de 200 cepas de Enterobacterias en los medios de referencia y el nuevo medio diseñado, confirman la seguridad del uso de la nueva formulación en el diagnóstico.

No se ha encontrado informes de estudios semejantes.

RECOMENDACIONES

Es una fórmula sencilla y fácil de reproducir en un Laboratorio Básico de Microbiología Clínica, económica y confiable en el diagnóstico, por lo que se recomienda su uso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Koneman E, Allen SD, Dowell VR, Sommers HM. Diagnóstico microbiológico. México: Editorial Médica Panamericana; 1989.
2. Bridson EY. The Oxoid Manual. 8thed. Inglaterra: Published by OXOID; 1998.
3. Rodríguez Martínez C, Zhurbenko R. Manual de Medios de Cultivo. 2^aed. La Habana: Centro Nacional de Biopreparados BioCen; 2001.
4. Ramal N. Control de Calidad de los Medios de Cultivo utilizados en el Diagnóstico Microbiológico. La Habana : Ministerio de Salud Pública; 1990.
5. Organización Mundial de la Salud. Métodos Básicos de Laboratorios en Bacteriología Clínica. Ginebra : OMS; 1993.
6. Weng Alemán Z, Iglesias Fernández B, Abreu Orta M, Beltrán Díaz JR. Control de medios de cultivo con empleo de cepas bacterianas autóctonas como patrones secundarios de referencias[Internet]. Rev Cubana Hig Epidemiol. 2004[citado 22 sep 2009]; 42(1). Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/hie/vol42_1_04/hie04104.htm
7. Baryarre H, Hersford R. Metodología de la Investigación. La Habana: Editorial de Ciencias Médicas; 2004.
8. Baryarre H, Hersford R, Oliva M. Estadística descriptiva y estadística de salud. La Habana: Editorial Ciencias Médicas; 2005.
9. Wikipedia.org[internet]. Prueba del indol. [actualizada 2008 oct, citado 22 sep 2009]. Disponible en: http://www.es.wikipedia.org/wiki/Prueba_del_indol
10. Panreac.com[internet]. Panreac Química S.A. CODIGO PRODUCTO: 413782 Manitol Movilidad. APLICACIONES. [Citado 27 oct 2009] Disponible en: <http://www.panreac.com/new/esp/.../413782ES.HTM>

11. Britanialab.com [internet]. Cistina Tripteína Agar (C.T.A.). [citado 27 oct 2009] Disponible en: <http://www.britanialab.com.ar/esp/.../cistinatriptagar.htm>
12. Comprante.gob [internet]. Medio de cultivo preparado, medio movilidad indol ornitina (mio) para aislar salmonella. [citado 2 Abr 2009]. Disponible en: web.compranet.gob.mx:8000/.../C2DetaLic.detalle?

Tabla 1. Resultados de la siembra concurrente utilizando los medios de referencia y el nuevo medio.

MICROORGANISMO	MOTILIDAD (referencia)		AGUA DE TRIPTONA (referencia)		MOTILIDAD - INDOL (Nuevo medio)				TOTAL
	M +	M -	I +	I -	M +	M -	I +	I -	
Escherichia coli	46	0	46	0	46	0	46	0	46
Enterobacter	26	0	8	18	26	0	8	18	26
Klebsiella	0	43	28	15	0	43	28	15	43
Proteus	33	0	12	21	33	0	12	21	33
Citrobacter	17	0	0	17	17	0	0	17	17
Salmonella	23	0	0	23	23	0	0	23	23
Shigella	0	12	2	10	0	12	2	10	12
TOTAL	145	55	96	104	145	55	96	104	200

Leyenda: M: Motilidad I: Indol + : positivo - : negativo